

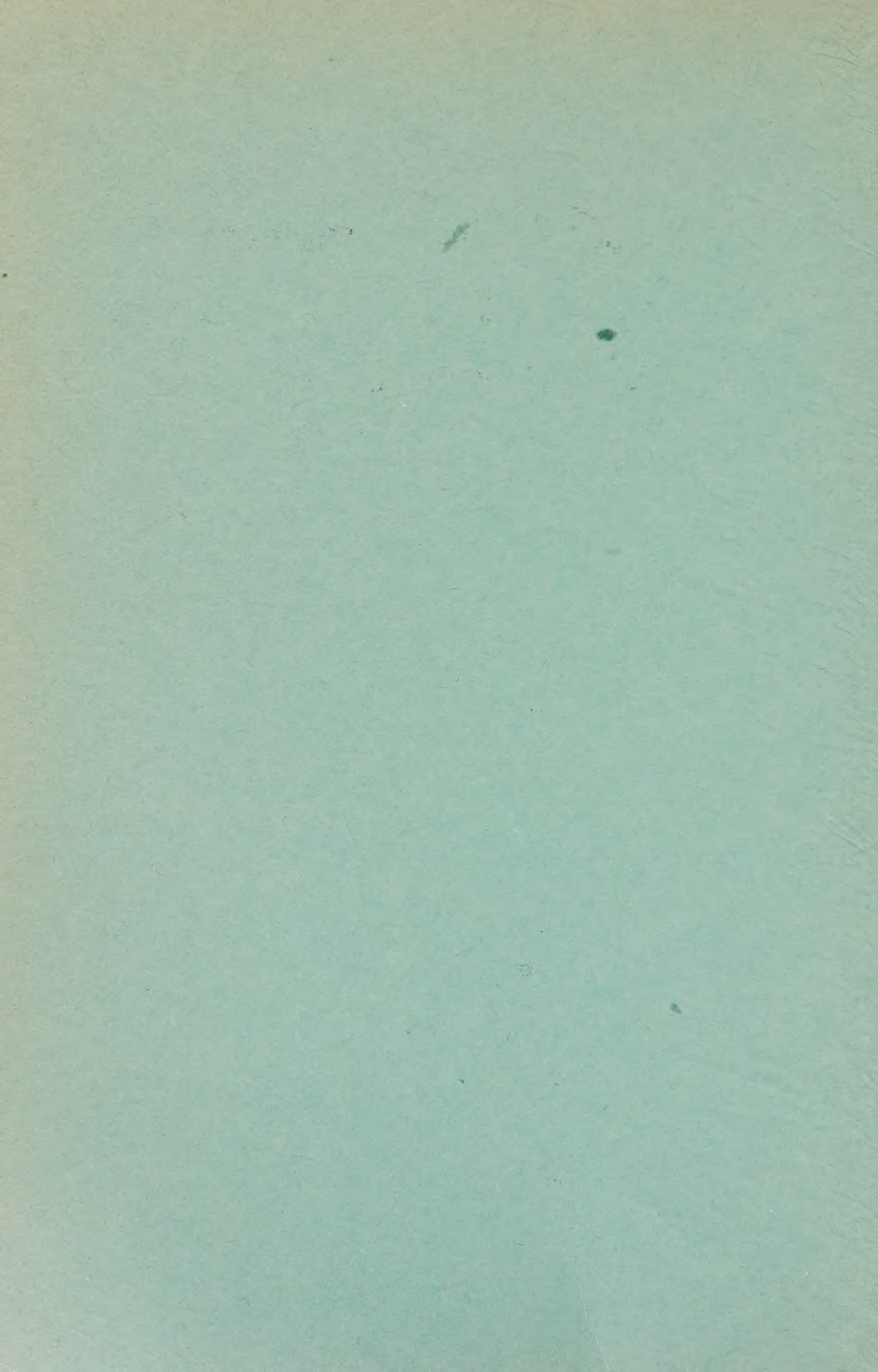
Das quantitative Verhalten
der Lipoproteine des Fruchtwassers
im Verlauf der Schwangerschaft

vorgelegt von

Friedrich Hartog

aus Bielefeld

München 1977



AUS DER I. FRAUENKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. J. Zander

DAS QUANTITATIVE VERHALTEN DER
LIPOPROTEINE DES FRUCHTWASSERS
IM VERLAUF DER SCHWANGERSCHAFT

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

F r i e d r i c h H a r t o g

aus Bielefeld

München 1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. H. Lochmüller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. J. Zander

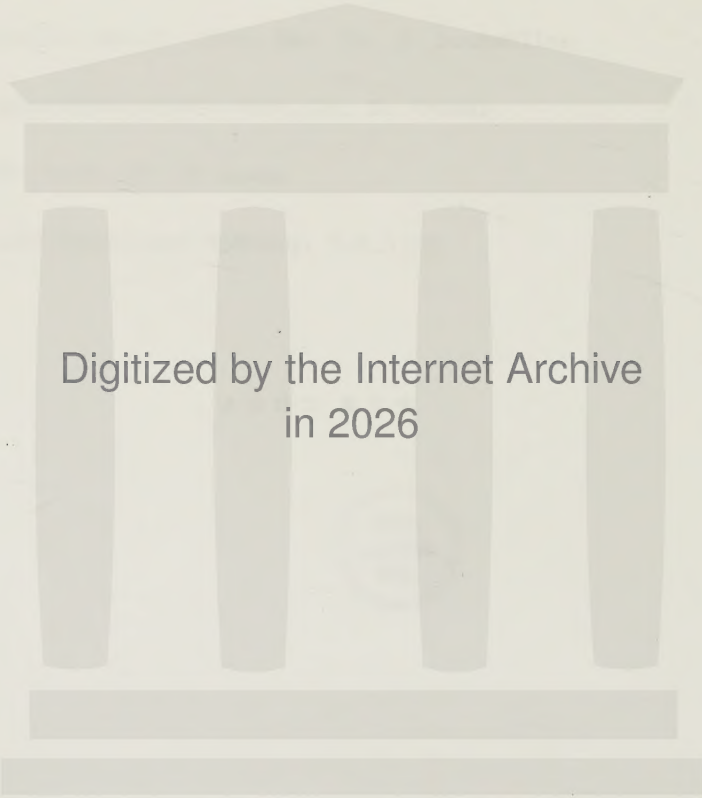
Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 5.8.1977



1	Einleitung	1
2	Methodik	2
3	Ergebnisse	3
4	Diskussion	4
5	Fazit	5
6	Literaturverzeichnis	6
7	Anhang	7
8	Abkürzungen	8
9	Formeln	9
10	Statistische Tabellen	10
11	Diagramme	11
12	Abbildung	12
13	Tabellen	13
14	Diagramme	14
15	Abbildung	15
16	Tabellen	16
17	Diagramme	17
18	Abbildung	18
19	Tabellen	19
20	Diagramme	20
21	Abbildung	21
22	Tabellen	22
23	Diagramme	23
24	Abbildung	24
25	Tabellen	25
26	Diagramme	26
27	Abbildung	27
28	Tabellen	28
29	Diagramme	29
30	Abbildung	30
31	Tabellen	31
32	Diagramme	32
33	Abbildung	33
34	Tabellen	34
35	Diagramme	35
36	Abbildung	36
37	Tabellen	37
38	Diagramme	38
39	Abbildung	39
40	Tabellen	40
41	Diagramme	41
42	Abbildung	42
43	Tabellen	43
44	Diagramme	44
45	Abbildung	45
46	Tabellen	46
47	Diagramme	47
48	Abbildung	48
49	Tabellen	49
50	Diagramme	50
51	Abbildung	51
52	Tabellen	52
53	Diagramme	53
54	Abbildung	54
55	Tabellen	55
56	Diagramme	56
57	Abbildung	57
58	Tabellen	58
59	Diagramme	59
60	Abbildung	60
61	Tabellen	61
62	Diagramme	62
63	Abbildung	63
64	Tabellen	64
65	Diagramme	65
66	Abbildung	66
67	Tabellen	67
68	Diagramme	68
69	Abbildung	69
70	Tabellen	70
71	Diagramme	71
72	Abbildung	72
73	Tabellen	73
74	Diagramme	74
75	Abbildung	75
76	Tabellen	76
77	Diagramme	77
78	Abbildung	78
79	Tabellen	79
80	Diagramme	80
81	Abbildung	81
82	Tabellen	82
83	Diagramme	83
84	Abbildung	84
85	Tabellen	85
86	Diagramme	86
87	Abbildung	87
88	Tabellen	88
89	Diagramme	89
90	Abbildung	90
91	Tabellen	91
92	Diagramme	92
93	Abbildung	93
94	Tabellen	94
95	Diagramme	95
96	Abbildung	96
97	Tabellen	97
98	Diagramme	98
99	Abbildung	99
100	Tabellen	100

FÜR CORA



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555615_0088

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I.	Einleitung	1
II.	Methodik	2
	A. Patienten	2
	B. Amniocentese	2
	C. Aufarbeitung des Fruchtwassers	3
	D. Analytik	3
	1. Bestimmung des Lecithin-Sphingomyelin-Quotienten (L/S Ratio)	
	2. Δ E Bestimmung	
	3. Gesamteiweißbestimmung	
	4. Albuminbestimmung	
	5. Isolierung der Serum High Density Lipoproteins (Serum HDL) als Standard für die Apo A Bestimmung	
	6. Quantitative Apo A Bestimmung	
	7. Immunpräzipitation nach Ouchterlony	
	8. Immunelektrophorese	
	9. Präzipitationslipoproteinelektrophorese	
	10. Lipoproteinelektrophorese	
III.	Ergebnisse	13
IV.	Diskussion	44
V.	Zusammenfassung	54
VI.	Literaturverzeichnis	55
	Lebenslauf	61

I. EINLEITUNG

Die Plasmalipoproteine sind als Träger der Lipide seit langem bekannt und waren in der letzten Dekade hinsichtlich ihrer Struktur und Funktion Gegenstand umfangreicher Untersuchungen (12).

Nach ihrem Verhalten in der präparativen Ultrazentrifuge lassen sich die Lipoproteine in drei Gruppen einteilen:

1. Very-Low-Density-Lipoproteins, (VLDL), Lipoproteine sehr niedriger Dichte,
($d = 0.9 - 1.006 \text{ g/ml}$)
2. Low-Density-Liporoteins, (LDL), Lipoproteine niedriger Dichte,
($d = 1.006 - 1.063 \text{ g/ml}$)
3. High-Density-Lipoproteins, (HDL), Lipoproteine hoher Dichte,
($d = 1.063 - 1.21 \text{ g/ml}$)

In chemischen und immunologischen Studien konnte die Heterogenität der verschiedenen Dichteklassen hinsichtlich ihres Proteingehalts, dem Apo-Protein, nachgewiesen werden. Es fanden sich vier Apolipoproteine, die sich in ihrer Aminosäurezusammensetzung, wie in ihren endterminalen Aminosäuren, ihrem Molekulargewicht, wie ihrem Antigenverhalten voneinander unterscheiden.

Es sind zu trennen:

1. Apolipoprotein A (Apo A)
2. Apolipoprotein B (Apo B)
3. Apolipoprotein C (Apo C)
4. Apolipoprotein D (Apo D)

Das Apo A stellt - neben geringen Mengen von Apo C - den Hauptproteinanteil der HDL.

In jüngster Zeit gelang es K u f n e r (23) und W e n g e l e r (41) mit einer neuartigen Präzipitationsmethode (35) erstmalig, regelmäßig Lipoproteine im Fruchtwasser nachzuweisen. Elektrophoretisch stellte sich nur der HDL dar, und als alleiniger Proteinanteil konnte Apo A identifiziert werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, im Fruchtwasser das quantitative Verhalten der Lipoproteine - i.e. des Apo A - im Verlauf der Gestation bei gleichzeitiger Bestimmung des Gesamteiweißes, des Albumins, der Bilirubinoide (ΔE) und des Lecithin Sphingomyelin Quotienten (L/S Ratio) zu untersuchen.

II. METHODIK

A. Patienten

Im Rahmen dieser Studie wurde Fruchtwasser von 32 verschiedenen Patientinnen zwischen der 21. und der 38. Schwangerschaftswoche untersucht. Die Indikation zur Amniocentese war entweder durch eine RH-Inkompatibilität mit positiven Antikörpern im indirekten Coombstest oder durch die Frage nach der foetalen Lungenreife gegeben. Im Einzelfall wurde bis zu fünf Mal amniocentiert. Nähere Einzelheiten sind in den Tabellen 1 bis 32 aufgeführt.

B. Amniocentese

Bei allen Patientinnen wurde die Amniocentese nach der

Anleitung von O. K a e s e r, V. F r i e d b e r g, K. O b e r, K. T h o m s e n, J. Z a n d e r (22) durchgeführt. Sämtliche Amniocentesen verliefen komplikationslos. Es kamen jeweils ca. 10-15 ml Fruchtwasser zur Untersuchung. Mit Blut kontaminierte Proben wurden eliminiert.

C. Aufarbeitung des Fruchtwassers

Sofort nach der Entnahme wurden die Fruchtwasserproben bei 800 x g fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abpipettiert, wobei streng darauf geachtet wurde, keine Vernix Caseosa mitaufzunehmen. Anschließend wurden die Proben bei minus 20° C in einem verschlossenen Reagenzglas bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Der Zellen und feste Bestandteile enthaltende Unterstand wurde verworfen.

Die zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Fruchtwasserproben einer einzelnen Patientin wurden jeweils gemeinsam an einem Tag untersucht. Zur Kontrolle lief jeweils ein interner Standard mit.

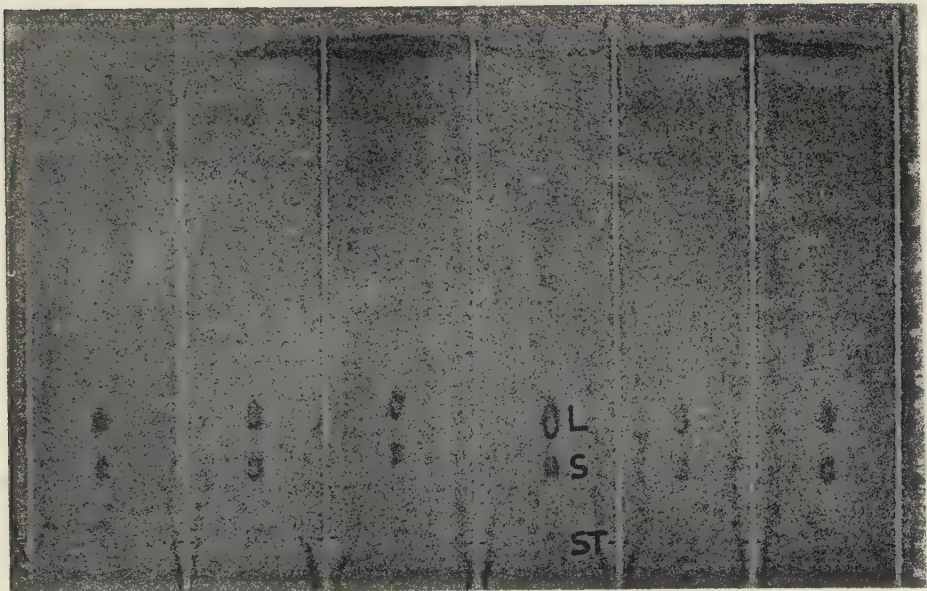
D. Analytik

1. Bestimmung des Lecithin-Sphingomyelin-Quotienten (L/S Ratio)

Die L/S Ratio wurde nach der Methode von G l u c k (15) in der Modifikation nach B o r e r (16) bestimmt.

2. Δ E Bestimmung

Der Δ E Wert wurde im biochemischen Labor der I. Universitätsfrauenklinik (Leiter Prof. Dr. Dr. K u ß) bei 450 nm in einem Eppendorffphotometer nach der Methode von L i l e y (24, 25) gemessen.



. Abb. I Typische Dünnschichtchromatographieplatte, mit deren Hilfe der L/S Quotient berechnet wurde.

L = Lecithin

S = Sphingomyelin

ST = Start

3. Gesamteiweißbestimmung

Das Gesamteiweiß der Fruchtwasserproben sowie die Kontrollsubstanzen (Standard HDL, Standard Albumin) wurden in einem Dreifachansatz nach der Biuretmethode mit einem Eppendorffphotometer bestimmt. Der Proteingehalt wurde außerdem nach der Methode von L o w r y (26) überprüft.

4. Albuminbestimmung

Mit Hilfe von Behring Immundiffusionsplatten (Partigen Albuminplatten, Batch No. 02/03 bzw. Batch No. 02/01) wurde der Albumingehalt des Untersuchungsmaterials bestimmt. Die Standardverdünnungsreihe wurde mit einem Humanalbumin der Fa. Behring (Batch No. ORHA20/21) hergestellt.

Die Auswertung erfolgte nach Anleitung der Behring-Broschüre "Partigenimmundiffusionsplatten" und geht auf Arbeiten von M a n c i n i et al. (27) und B e c k e r (1, 2) zurück.

Eine typische Partigen Albuminplatte zeigt Abb. II, wobei 1-3 einer Standardreihe, 5-12 Patientenproben entspricht. Die Einzelwerte werden aus dem Durchmesser (d) der Präzipitationsringe errechnet.

Mit den Standardwerten wurde für jede Partigenplatte gesondert ein Auswertungsdiagramm zur Berechnung der Einzelwerte erstellt. Abb. III zeigt ein typisches Beispiel.

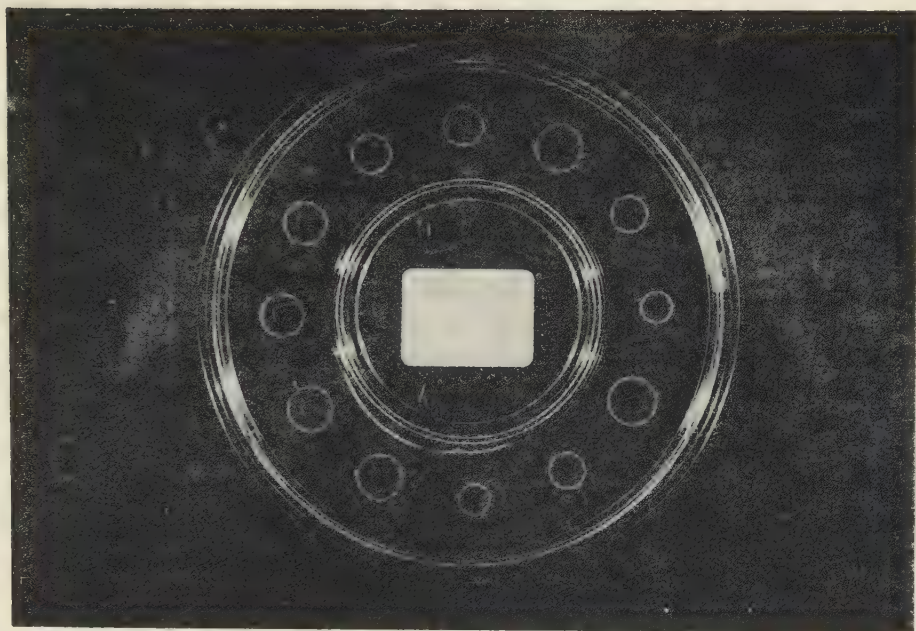


Abb. 2 Abb II zeigt eine typische Partigen Albuminplatte.
Die Standardverdünnungen sind an den Punkten
1-3 aufgetragen

- 1 = 0.525 g/100 ml Albumin
- 2 = 0.2625 g/100 ml Albumin
- 3 = 0.175 g/100 ml Albumin

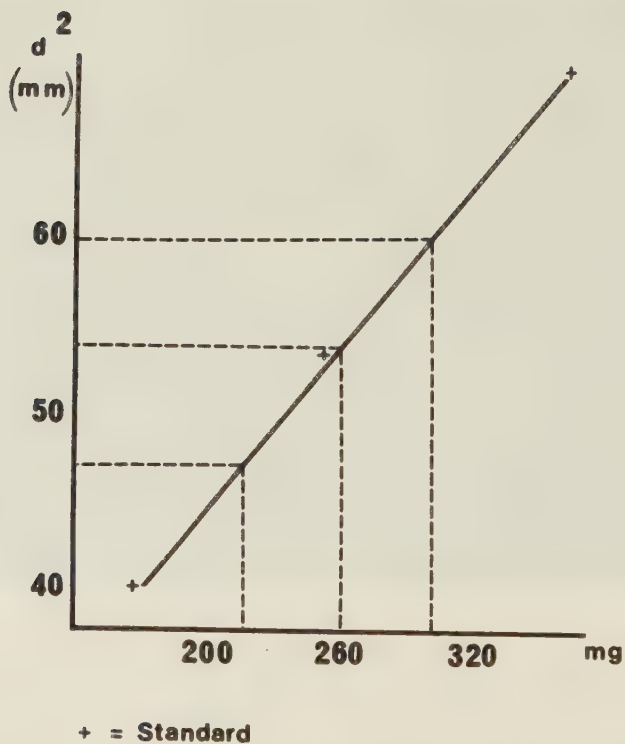


Abb. III Albuminauswertungsdiagramm am Beispiel der Patientin No. 5 (Ergebnistabelle S. 19)

5. Isolierung der Serum High Density Lipoproteins
(Serum HDL) als Standard für die Apo A Bestimmung.

Zur Isolierung der Serum HDL wurden 450 ml Serum einer gesunden Probandin (12 Stunden postprandial) auf dem üblichen Weg mittels der präparativen Ultrazentrifuge (Modell Beckman Sphincto 65 L II B, Rotor 50 TI) aufgetrennt (13, 14). Die HDL Fraktion wurde aufgenommen und 24 Std. gegen 0.9 % NaCl-Lösung unter Zusatz von Na-Azid dialysiert und anschließend als Standard verwendet. Die Reinheit der Fraktion prüften wir mittels der Immundiffusion nach Ouchterlony (30-32).

6. Quantitative Apo A Bestimmung

a. Herstellung der Radialimmundiffusionsplatte

Einer 0.7 % Agarlösung (Agar-Agar Serva No. 11394) wurden 0.02 ml Anti α_1 Lipoprotein (Behring Batch No. 2792 F) pro ml zugesetzt. Auf einer zuvor gereinigten Partigenplatte wurden 5 ml gleichmäßig verteilt, abgedeckt und bei +4° C aufbewahrt. Auf diese Weise kann die Platte bis zu 6 Tagen gelagert werden, die Bestimmungen wurden jedoch in der Regel innerhalb von 48 Stunden nach Herstellung der Platte durchgeführt.

b. Auftragen der Proben

Mit einem Korkbohrer wurden 12 Zylinder je Platte mit einem Durchmesser von 3,7 mm ausgestanzt. Die Auftragsstellen wurden mit jeweils 0.015 ml der zu untersuchenden Flüssigkeit beimpft. Als Standard benutzten wir eine Verdünnungsreihe des isolierten Serum HDLs.

c. Diffusionsdauer

Bei +22° C ließen wir das Fruchtwasser drei Tage diffundieren, um dann zwei weitere Tage nicht prä-

zipitierte Fruchtwasserproteine und überschüssiges Anti α_1 Lipoprotein mit einer 0.9 % NaCl Lösung auszuwaschen. Anschließend wurden die Proben auf einen Objektträger gebracht und bei +37° C vorsichtig im Brutschrank getrocknet.

d. Anfärben

Zur besseren Darstellung der Präzipitationsringe wurden die getrockneten Gele eine halbe Stunde mit Coomassie Blue gefärbt. Danach wurde mit 7 % Essigsäure 2 1/2 Stunden bei +70° C entfärbt.

e. Auswertung

Die Auswertung erfolgte wie bei den Albuminbestimmungen nach Anleitung der Behring Broschüre "Partigen-Immundiffusionsplatten". Voruntersuchungen zeigten, daß die Meßgenauigkeit unserer Methode +/- 10 Prozent beträgt.

Abb. IV zeigt eine typische Apo A Radialimmundiffusionsplatte (RID Platte) nach der Anfärbung mit Coomassie Blue.

Zur Auswertung wurde wiederum der Durchmesser (d) der Präzipitationsringe gemessen und d^2 in ein Auswertungsdiagramm eingetragen.

Abb. V zeigt das Auswertungsdiagramm der Patientin No. 5.

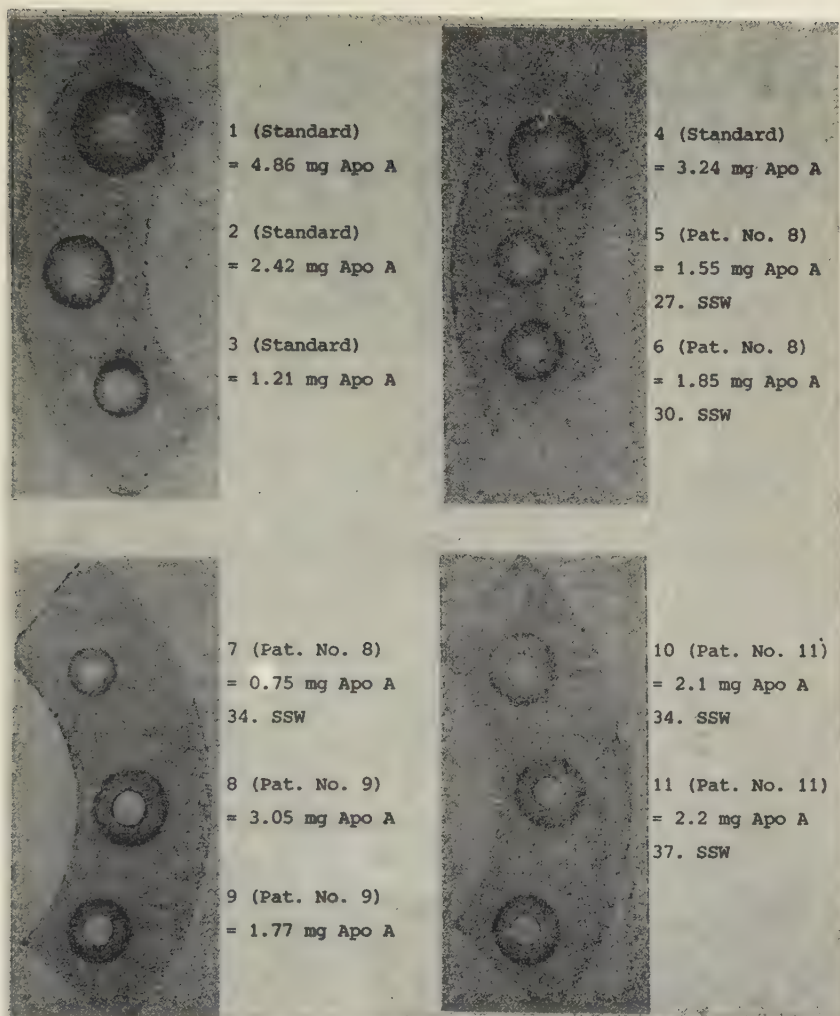


Abb. IV Typische Apo A RID-Platte

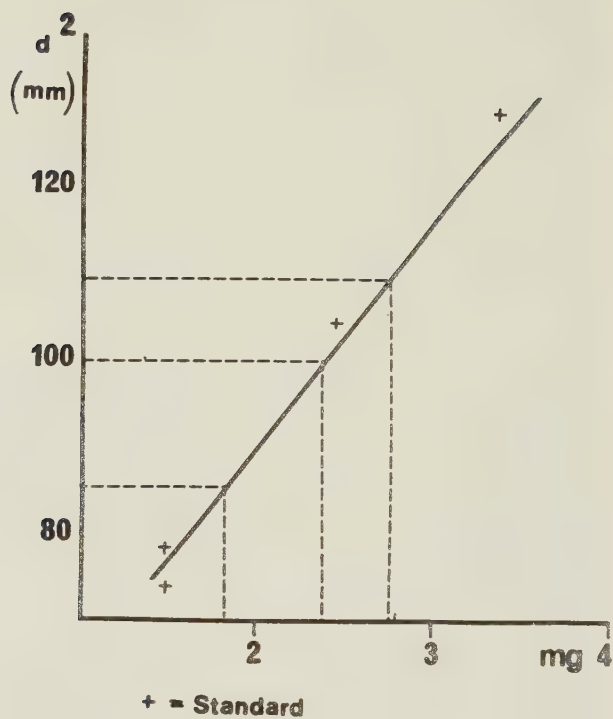


Abb. V Apo A Auswertungsdiagramm am Beispiel der Patientin No. 5 (Ergebnistabelle S. 19)

7. Immunpräzipitation nach Ouchterlony (30-32)

Sämtliche Fruchtwasserproben wurden in 1 % Agar unter Verwendung eines Veronalpuffers von pH 8.6 auf ihren Gehalt an Apo A, Apo B und Apo C getestet. Hierfür verwandten wir spezifische Antiseren aus dem Labor von Herrn Prof. Dr. S e i d e l, Heidelberg, bzw. Anti α_1 - und Anti β -Lipoproteinserum der Firma Behring (ORGC 04/05 Batch No. 2582 D).

8. Immunelektrophorese

Die Immunelektrophorese wurde in 1 % Agar nach G r a b a r al. (17) unter Verwendung eines Veronalpuffers von pH 8.6 und einer Ionenstärke von 0.05 durchgeführt. Die Platten wurden bei +37° C über 36 Stunden inkubiert.

9. Präzipitationslipoproteinelektrophorese

Die Präzipitationslipoproteinelektrophorese wurde nach S e i d e l (35) unter Verwendung eines Veronalpuffers (pH 8.6, Ionenstärke 0.05) durchgeführt.

10. Lipoproteinelektrophorese

Die Lipoproteinelektrophorese wurde nach der von G r e t e n et al. (18, 19) angegebenen Methode durchgeführt. Als Färbemittel verwandten wir Ölrot O.

III. ERGEBNISSE

In den Tabellen 1-32 sind die Ergebnisse der Untersuchungen summarisch aufgeführt.

Zur Vereinfachung werden folgende Abkürzungen benutzt:

Ak-Titer	=	Antikörpertiter im indirekten Coombs Test
SSW	=	Schwangerschaftswoche
L/S	=	Lecithin Sphingomyelin Quotient
E	=	Δ E-Wert, gemessen bei 450 nm
Prot	=	Gesamteiweiß in mg/100 ml
Alb	=	Albumin in mg/100 ml
Apo A	=	Apo A Gehalt in mg/100 ml

Die Einzelergebnisse für den Lecithin Sphingomyelin Quotienten, für den Δ E-Wert und das Gesamteiweiß stellen einen Mittelwert aus zwei Bestimmungen dar, das Apo A und das Albumin wurde aus drei Einzelwerten errechnet.

T A B E L L E N

No. 1 bis No. 32

Pat. No. 1
 geb.: 9.6.1945
 II. Para, III. Gravida
 Ak-Titer 1:40
 Geburt: 36. SSW

SSW	28	31	33	34	35
L/S	1.09	1.21	1.4	2.37	2.19
E	0.18	0.14	0.115	0.09	0.08
Prot	267	560	392	317	280
Alb	115	236	188	173	149
Apo A	0.86	2.17	1.58	1.42	1.3
<u>Alb</u> Apo A	133.7	108.7	119.0	121.8	114.6

Pat. No. 2

geb.: 2.2.1945

II. Para, II. Gravida

Ak-Titer: über 1:40

Bemerkungen: mehrfacher intrauteriner Blutaustausch. Nach der Geburt (Hydrops) erneuter Blutaustausch

SSW	23	26	29	31
L/S	1.1	1.3	2.2	4.0
E	0.3	0.34	0.32	0.31
Prot	450	500	430	570
Alb	275	285	260	312
Apo A	2.1	2.3	2.25	2.45
<u>Alb</u> Apo A	131	124	116	127

Pat. No. 3

geb.: 31.12.1938

III. Para, III. Gravida

Ak-Titer: 1:10

SSW	26	29	30	32
L/S	0.98	1.35	1.36	2.1
E	0.19	0.2	0.18	0.13
Prot	775	850	600	560
Alb	452	510	330	308
Apo A	2.45	2.45	2.0	1.55
<u>Alb</u> Apo A	184	204	165	198

Pat. No. 4

geb.: 5.2.1942

III. Para, III. Gravida

Ak-Titer 1:10

Geburt: 37. SSW

Besonderheiten: 1970 Hydrops in der 38. SSW

SSW	29	32	35
L/S	1.09	1.15	4.6
E	0.1	0.07	0.11
Prot	410	250	285
Alb	208	137	120
Apo A	2.69	1.9	1.64
<u>Alb</u>			
Apo A	77.5	71.5	73.2

Pat. No. 5

geb.: 29.12.1942

III. Para, III. Gravida

Ak-Titer 1:10

Geburt: 38. SSW

SSW	26	30	33
L/S	1.07	1.23	1.77
E	0.12	0.08	0.06
Prot	590	447	358
Alb	300	260	216
Apo A	2.7	2.4	1.85
<u>Alb</u> Apo A	111.1	108.3	116.7

Pat. No. 6

geb.: 10.10.1944

Ak-Titer 1:10

Geburt: 37. SSW (sofortiger Blutaustausch
postpartal)

SSW	27	30	32
L/S	0.9	1.2	1.3
E	0.1	0.1	0.07
Prot	770	665	570
Alb	520	370	400
Apo A	4.35	3.75	3.1
<u>Alb</u> Apo A	122	98.9	129

Pat. No. 7

geb.: 31.10.1947

II. Para, III. Gravida

Ak-Titer 1:40

Geburt: 39. SSW (einmaliger Blutaustausch
postpartal)

SSW	30	33	37
L/S	1.2	1.25	1.8
E	0.08	0.05	0.05
Prot	470	287	335
Alb	225	130	150
Apo A	2.3	1.35	1.45
<u>Alb</u> Apo A	98	96.5	107

Pat. No. 8

geb.: 31.1.1937

II. Para, II. Gravida

Ak-Titer 1:10

Geburt: 40.SSW

SSW	27	30	34
L/S	0.73	1.4	4.0
E	0.1	0.06	0.03
Prot	370	335	195
Alb	150	138	50
Apo A	1.47	1.73	0.83
<u>Alb</u> Apo A	102	80	60.5

Pat. No. 9

geb.: 14.4.1949

III. Para, IV. Gravida

Ak-Titer 1:10

Geburt: 37. SSW

SSW	27	31	33
L/S	1.15	1.57	2.1
E	0.14	0.08	0.085
Prot	650	430	420
Alb	395	215	190
Apo A	3.12	2.0	2.06
<u>Alb</u>			
Apo A	126	107	92

Pat. No. 10

geb.: 14.12.1946

Ak-Titer 1:256

Geburt: 38. SSW (postpartal zweimaliger
Blutaustausch)

SSW	28	34	36
L/S	1.14	2.5	2.9
E	0.19	0.09	0.06
Prot	525	420	360
Alb	288	190	118
Apo A	2.6	2.55	2.3
<u>Alb</u> Apo A	125	75	51.5

Pat. No. 11

geb.: 15.4.1943

II. Para, II. Gravida

SSW	30	34	37
L/S	1.06	2.0	6.0
E	0.04	0.03	0.01
Prot	390	240	240
Alb	200	115	100
Apo A	3.0	2.2	2.2
<u>Alb</u> Apo A	66.9	52.5	45.5

Pat. No. 13

geb.: 12.3.1941

I. Para, I. Gravida

Ak-Titer 1:21

SSW	35	36
L/S	1.08	1.43
E	0.06	0.05
Prot	344	348
Alb	201	183
Apo A	1.97	1.75
<u>Alb</u> Apo A	102	104.5

Pat. No. 12
 geb.: 28.11.1942
 II. Para, II. Gravida
 Ak-Titer 1:10
 Geburt: 27. SSW (Totgeburt)

SSW	25	27
L/S	1.0	1.3
E	0.27	0.27
Prot	730	790
Alb	500	500
Apo A	5.0	4.5
<u>Alb</u>		
Apo A	100	111

Pat. No. 14
 geb.: 6.4.1944
 II. Para, II. Gravida
 Ak-Titer 1:10
 Geburt: 38. SSW

SSW	28	30
L/S	1.4	1.9
E	0.14	0.08
Prot	340	290
Alb	202	190
Apo A	1.7	1.6
<u>Alb</u>		
Apo A	119	118.5

Pat. No. 15

geb.: 17.5.1942

III. Para, III. Gravida

Ak-Titer 1:10

SSW	24	26
L/S	1.14	1.1
E	0.22	0.16
Prot	570	390
Alb	187	115
Apo A	1.85	1.1
<u>Alb</u> Apo A	101	104.5

Pat. No. 16
 geb.: 1.1.1945
 II. Para, II. Gravida
 Ak-Titer 1:16

SSW	26	33
L/S	1.15	1.32
E	0.1	0.06
Prot	382	330
Alb	198	112
Apo A	1.97	0.92
<u>Alb</u>		
Apo A	112.5	1.21

Pat. No. 17

geb.: 20.10.1946

II. Para, II. Gravida

Ak-Titer.1:10

Geburt: 28. SSW

Bemerkungen: 23. SSW schwerer grippaler

Infekt, Kind am 5. Tag p.p. verstorben

SSW	26
L/S	1.08
E	0.38
Prot	813
Alb	416
Apo A	3.72
<u>Alb</u>	
Apo A	112

Pat. No. 18

geb.: 7.7.1946

II. Para, II. Gravida

SSW	24
L/S	1.5
E	0.2
Prot	540
Alb	325
Apo A	3.2
<u>Alb</u>	101.5
Apo A	

Pat. No. 19
geb.: 12.4.1946
II. Para, II. Gravida
Ak-Titer 1:10
Geburt: 36. SSW spontan

SSW	36
L/S	1.8
E	0.06
Prot	255
Alb	122
Apo A	1.26
<u>Alb</u>	
Apo A	97

Pat. No. 20

geb.: 26.2.1956

VII. Para, VIII. Gravida

Ak-Titer 1:10

Geburt: 22. SSW (Abortus inkompl.)

SSW	21
L/S	1.07
E	0.54
Prot	855
Alb	502
Apo A	4.1
<u>Alb</u>	
Apo A	122.5

Pat. No. 21

geb.: 6.3.1942

V. Para, V. Gravida

Ak-Titer 1:10

SSW	25
L/S	1.0
E	0.22
Prot	790
Alb	408
Apo A	3.5
<u>Alb</u>	
Apo A	132.5

Pat. No. 22

geb.: 28.8.1947

V. Para, VI. Gravida

Ak-Titer 1:40

Geburt: 38. SSW (das Kind verstarb kurz nach
der Geburt)

SSW	25
L/S	1.1
E	0.23
Prot	930
Alb	502
Apo A	3.9
<u>Alb</u>	
Apo A	129

Pat. No. 23

geb.: 28.10.1940

II. Para, V. Gravida

Ak-Titer 1:10

Bemerkungen: Gemini

SSW	28
L/S	1.06
E	0.1
Prot	505
Alb	255
Apo A	3.48
<u>Alb</u>	
Apo A	79

Pat. No. 24

geb.: 4.12.1949

II. Para, II. Gravida

Ak-Titer 1:40

Geburt: 43. SSW (Mißbildungen)

SSW	36
L/S	1.75
E	0.11
Prot	385
Alb	185
Apo A	1.4
<u>Alb</u>	
Apo A	132

Pat. No. 25

SSW	35
L/S	1.1
Prot	265
Alb	128
Apo A	2.2
<u>Alb</u>	
Apo A	58.8

Pat. No. 26

SSW	30
L/S	2.0
Prot	765
Alb	500
Apo A	6.05
<u>Alb</u>	
Apo A	83.8

Pat. No. 27

SSW	36
L/S	1.7
Prot	300
Alb	145
Apo A	1.3
<u>Alb</u>	
Apo A	111.5

Pat. No. 28

SSW	38
L/S	2.4
Prot	230
Alb	80
Apo A	1.6
<u>Alb</u>	
Apo A	50

Pat. No. 29

SSW	31
L/S	0.8
Prot	575
Alb	320
Apo A	3.6
Alb	
<u>Apo A</u>	89

Pat. No. 30

SSW	36
L/S	1.4
Prot	515
Alb	227
Apo A	1.72
Alb	
<u>Apo A</u>	132

Pat. No. 31

SSW	38
L/S	1.5
Prot	330
Alb	120
Apo A	1.35
<u>Alb</u>	
Apo A	89

Pat. No. 32

SSW	36
L/S	1.6
Prot	385
Alb	198
Apo A	2.2
<u>Alb</u>	
Apo A	90.2

Immunpräzipitation nach Ouchterlony (30-32)

In keiner der Fruchtwasserproben konnte - auch nach mehrfachem Ansatz - Apo B und/oder Apo C nachgewiesen werden. Es kam nur Apo A zur Darstellung.

Elektrophoresen

Mit der von G r e t e n et al. (18, 19) angegebenen Methode der Lipoproteinelektrophorese und der anschließenden Färbung mit Ölrot O konnten keine Lipoproteine nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu zeigte sich in der neuartigen Lipoproteinelektrophorese (Präzipitationselektrophorese nach S e i d e l (35)) regelmäßig eine Ausfällung im α_1 -Bereich, die den High Density Lipoproteins (HDL) entspricht.

Bei der in einigen Fällen gegen Anti Apo A Serum durchgeführten Immunelektrophorese bildete sich die typische HDL Präzipitationslinie im α_1 -Bereich aus.

IV. DISKUSSION

In der Literatur gibt es eine Reihe von Berichten über Proteine (4, 9, 11, 13, 20, 21, 33, 34, 36-42) und über den Lecithin Sphingomyelin Quotienten (L/S Ratio, Surfactant) (3, 5-8, 14-16, 28, 29) im Fruchtwasser.

Die Angaben über das Vorkommen von Lipoproteinen sind unterschiedlich. Übereinstimmung herrscht jedoch darüber, daß Lipoproteine mittels der herkömmlichen Lipoproteinelektrophorese niemals nachgewiesen werden konnten.

Erst kürzlich gelang K u f n e r (23) und W e n g e l e r (41) mit neuen Techniken der regelmäßige Nachweis von Lipoproteinen - es fanden sich ausschließlich High Density Lipoproteins (HDL) - im Fruchtwasser jenseits der 24. Schwangerschaftswoche. Als Proteinanteil konnte allein das Apo A identifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden sämtliche Fruchtwasserproben nach den gleichen Kriterien untersucht. Dabei konnten obige Ergebnisse bestätigt werden.

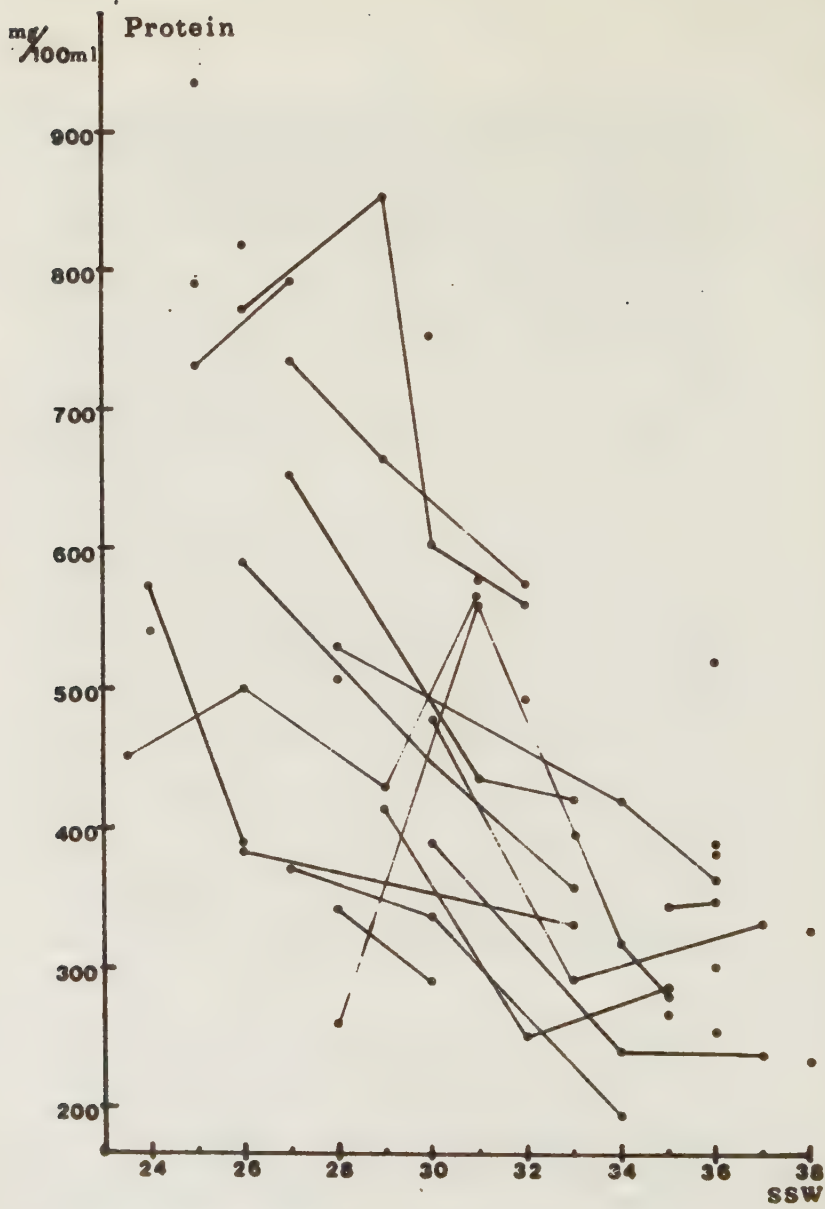
Das Ziel dieser Arbeit war es, erstmals das quantitative Verhalten der Lipoproteine des Fruchtwassers im Verlauf der Gestation zu untersuchen. Im Serum ist die Quantifizierung der einzelnen Lipoproteinfractionen (VLDL, LDL, HDL) nur mittels der präparativen Ultrazentrifuge möglich. Hierzu werden größere Mengen Serums (mindestens 50 ml) benötigt. Fruchtwasser steht jedoch in der Regel nicht in diesem Ausmaß zur Verfügung. Zur Mengenangabe der Lipoproteine des Fruchtwassers mußte daher nach einer anderen Methode gesucht werden.

Im Fruchtwasser kommen jenseits der 24. Schwangerschaftswoche keine VLDL und LDL vor. Als einziges Lipoprotein sind die HDL mit dem alleinigen Proteinanteil Apo A nachweisbar. Zur quantitativen Bestimmung eines einzelnen Proteins bietet sich die Radialimmundiffusionstechnik (RID) (27) an. Hierzu werden nur wenige μ l Untersuchungsmaterial benötigt.

Für einen Großteil der Proteine - nicht jedoch für das Apo A - stehen industriell gefertigte RID Platten zur Verfügung. Daher wurden spezielle Apo A RID Platten entwickelt, deren Meßgenauigkeit mit $\pm$ 10 Prozent den Angaben über Behring Albumin Partigenplatten entsprach.

Durch zahlreiche Untersuchungen (4, 11, 13, 20, 33, 34, 36-38, 40) ist sichergestellt, daß im Fruchtwasser das Gesamtprotein und das Albumin jenseits der 28. Schwangerschaftswoche kontinuierlich abnehmen, während die Phosphatide jenseits der 35. Schwangerschaftswoche zunehmen (3, 7, 8, 14, 15, 28, 29).

In den Abbildungen VI-VIII sind die Einzelwerte aus den Tabellen 1-32 graphisch dargestellt. Sie zeigen den Verlauf der Konzentrationen für das Gesamtprotein, das Albumin und das Apo A im Fruchtwasser.



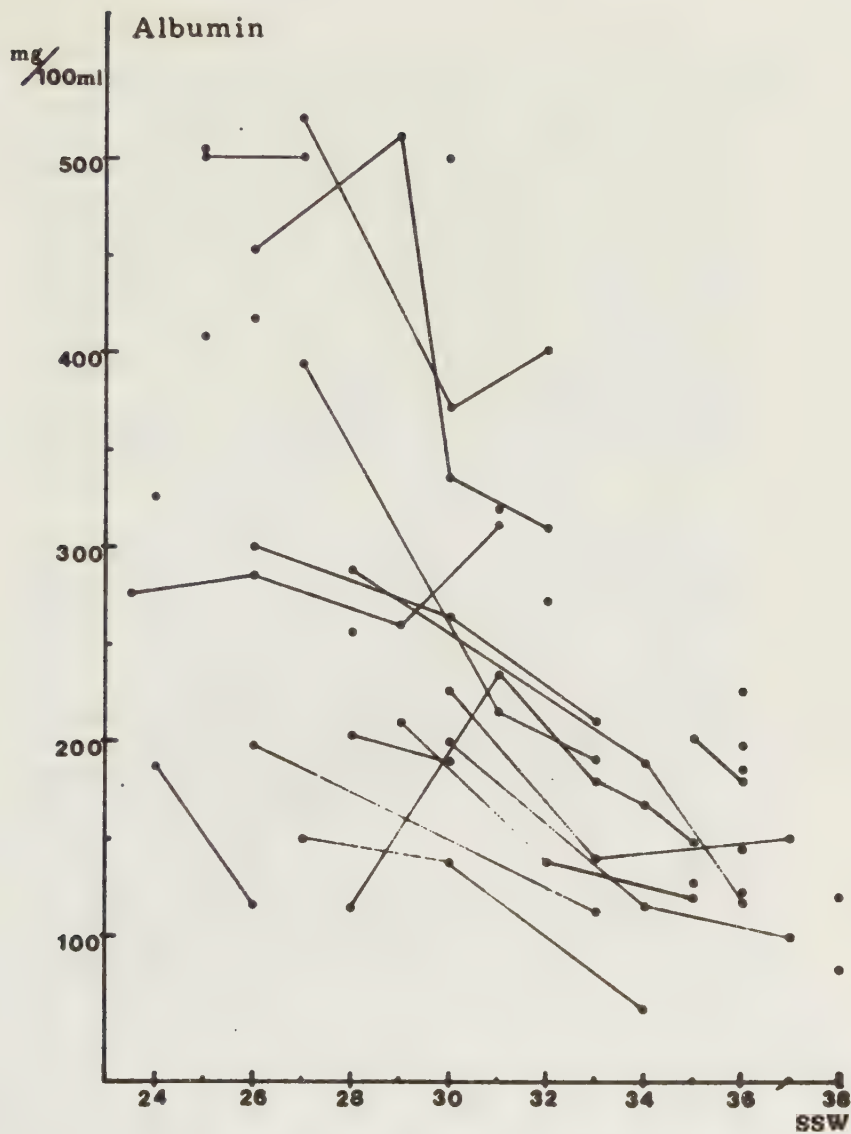


Abb. VII Gesamtverteilung des Albumins

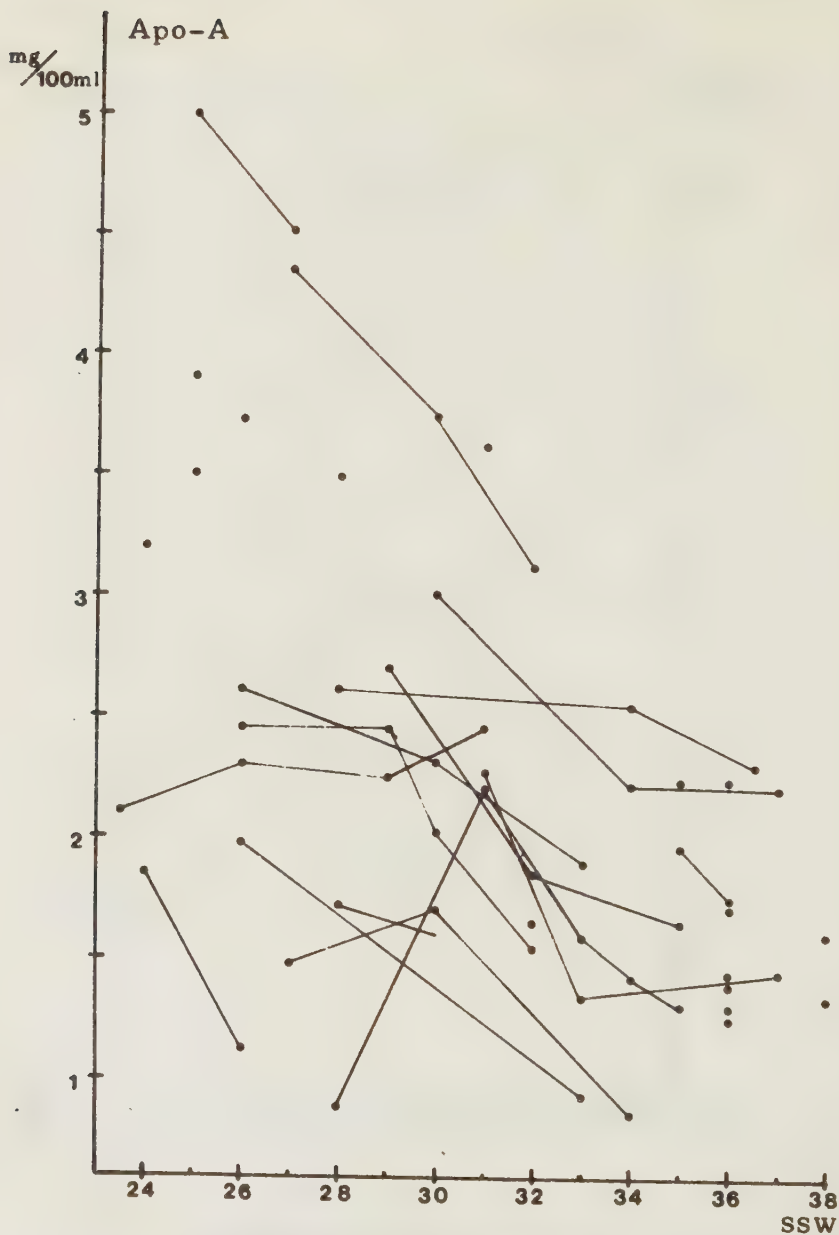


Abb. VIII Gesamtverteilung des Apo A

Wie aus den Abbildungen VI-VIII zu ersehen ist, fallen alle drei Parameter während der Schwangerschaft fast gleichmäßig und kontinuierlich ab. Die Absolutwerte sind von Patient zu Patient so unterschiedlich, daß keine Normalzahlen angegeben werden können. Nimmt man jedoch 1.5 mg Apo A/100 ml als Mittelwert am Ende der Schwangerschaft, so beträgt die Konzentration von Apo A im Fruchtwasser 1/10 der Konzentration im Nabelschnurblut, bzw. 1/100 der Konzentration im mütterlichen Serum (Originalzahlen für Mutter- und Nabelschnurserum aus Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 579, 1969). Vergleichszahlen anderer Autoren liegen nicht vor.

Die Werte für das Gesamtprotein im Fruchtwasser entsprechen denen von J o n a s s o n (21) und S u t c l i f f e (37), die Zahlen für das Albumin denen von F i s c h b a c h e r (11).

Da die Absolutwerte von Patient zu Patient sehr unterschiedlich sind, sollen hier die Verlaufswerte einer einzelnen Schwangerschaft am Beispiel der Patientin No. 1 (Tabelle S. 15) diskutiert werden.

Wie eingangs erwähnt, stammt der größte Teil der Fruchtwasserproben verständlicherweise von Patienten mit einer RH-Inkompatibilität.

Bei dieser Patientin war ebenfalls eine RH-Inkompatibilität diagnostiziert worden. Der Antikörpertiter im indirekten Coombstest betrug 1:40. Die Patientin selbst war bei einer vorhergehenden Schwangerschaft sensibilisiert worden. Aus diesem Grunde wurde von der 28. Schwangerschaftswoche an fünf Mal amniocentiert.

Der Δ E Wert als Zeichen des Schweregrades der fetalen Erythroblastose (24, 25) zeigte den Entbindungstermin für die 36. Schwangerschaftswoche an. Eine intrauterine Bluttransfusion war nicht notwendig. Zur Feststellung der fetalen Lungenreife wurde der L/S Quotient bestimmt (15). Er stieg im Verlauf der Gestation an und überschritt in der 34. Schwangerschaftswoche den Grenzwert 2.0. Das Gesamtprotein, das Albumin und das Apo A stiegen von der 28. zur 31. Schwangerschaftswoche zunächst an, um dann kontinuierlich abzufallen.

SSW	28	31	33	34	35
L/S	1.09	1.21	1.4	2.37	2.19
E	0.18	0.14	0.115	0.09	0.08
Prot	267	560	392	317	280
Alb	115	236	188	173	149
Apo A	0.86	2.17	1.58	1.42	1.3
<u>Alb</u> Apo A	133.7	108.7	119.0	121.8	114.6

Alle drei Parameter zeigen ein in etwa paralleles Verhalten.

Eine Ursache für die Abnahme der Proteine des Fruchtwassers im Verlauf der Schwangerschaft ist nicht bekannt (4), jedoch wird die Resorption durch den Verdauungstrakt des Feten diskutiert (34). Dieses könnte das in etwa gleiche Abfallen der Konzentrationen der einzelnen Proteine (siehe Albumin/Apo A Quotient) erklären.

C a s u (5) fand kürzlich ein Lipopeptid, welches ausschließlich im Fruchtwasser vorkommen und dem "Surfactant" entsprechen soll. Er untersuchte dieses Peptid nicht nach immunologischen Kriterien, insbesondere wurde nicht der Frage nachgegangen, ob es sich bei diesem Peptid um einen Teil des Apo A oder des HDL's handeln könnte. Da die Menge dieses Peptids jedoch im Verlauf der Schwangerschaft zunimmt, die des Apo A aber abnimmt, erscheint ein Zusammenhang zwischen beiden unwahrscheinlich. Bei dem von C a s u beschriebenen Peptid könnte es sich jedoch um einen weiteren Bestandteil des HDL's handeln.

Die Klärung dieses Problems bleibt weiteren Arbeiten überlassen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde erstmals das quantitative Verhalten der Lipoproteine - d.h. des Apo A - im Fruchtwasser während der Gestation untersucht. Dazu mußten zunächst speziell für diesen Zweck Radialimmundiffusionsplatten entwickelt werden.

Mit ihrer Hilfe wurde bei 15 Schwangerschaftsverläufen und 17 Einzelproben das Apo A bestimmt. Als Vergleichsparameter wurden die jeweiligen Konzentrationen des Gesamtproteins und des Albumins im Fruchtwasser ermittelt. Alle drei zeigten ein in etwa paralleles Verhalten. Sie stiegen zunächst an, um dann im letzten Trimenon bis zur Geburt kontinuierlich abzufallen.

Die Werte für das Gesamtprotein und das Albumin entsprachen der Literatur. Vergleichszahlen für das Apo A lagen nicht vor. Seine Konzentration beträgt am Ende der Schwangerschaft in etwa $1/10$ der des Nabelschnurserums, bzw. $1/100$ der des mütterlichen Serums.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Becker, W., Rapp, W., Schwick, H.G., Störiko:
Methoden zur quantitativen Bestimmung von Plasmaproteinen
durch Immunpräzipitation, Z. Klin. Biochem., 6, 113 (1968)
- 2 Becker, W.: Bestimmung von AS-Titern mit Hilfe der
Radialimmundiffusion, Immunochem. 6, 539, (1969)
- 3 Bhagwanani, S.G.: Prediction of neonatal respiratory
distress by estimation of amniotic fluid lecithin, Lancet,
1, 159 (1972)
- 4 Brusis, E., Nitsch, B., Wengeler, H.:
"Fruchtwasser und Amnion" in Klinik der Frauenheilkunde
und Geburtshilfe, Schwalm, H., Döderlein, G., Verlag
Urban und Schwarzenberg, 1975
- 5 Casu, A., Grimaldi, M., Monacelli, R.: Analisi di pro-
teini e fosfolipidi del liquido amniotico umano,
Acta Path., 67, 395-403 (1975)
- 6 Clements, J.A: The alvelar lining layer. In:
Development of the lung. Ciba Found. Symp.
Boston: Little Brown and Comp. 1967
- 7 Clements, J.A. et al.: assessment of the respiratory
distress syndrome by a rapid test for surfactant in
amniotic fluid, N. Engl. J. Med., 286, 1077 (1972)

- 8 Clements, J.A.: Composition and properties of pulmonary surfactant, in: Villee, C.A.: Respiratory distress syndrome, 77, Academic Press, N.Y., 1973
- 9 Derrington, M.M., Soothill, J.F.: Immunological study of amniotic fluid and maternal and fetal serum, J. Obstet. Gyn. Brit. Comm. 68, 755-61 (1961)
- 10 Ewing et al.: Analysis of human serum lipoprotein distributions, Adv. Lip. Res. 3, 25, (1965)
- 11 Fischbacher, P.H., Quinlivan, W.L.G.: Qualitative and quantitative analysis of the proteins in amniotic fluid, Am. J. Obstet. Gyn. 108, 1051-5, (1970)
- 12 Frederickson, D.S.: New Engl. J. Med. 276, 32-44, 94-103, 148-56, 215-26, 273-81, (1967)
- 13 Gitlin, D., Biasucci, A.: Development of proteins in the human conceptus, J. Clin. Invest., 48, 1433, (1969)
- 14 Gluck, L., Kulovich, M.V., Eidelman, A.I.: Biochemical development of surface activity in mammalian lung. Pediat. Res. 1, 237 (1967)
- 15 Gluck, L., Kulovich, M., Borer, R.C., Brenner, Anderson, R.H.: Diagnosis of the respiratory distress syndrome by amniocentesis, Amer. J. Obst. Gyn. 109, 440 (1971)

- 16 Gluck, L.: Procedure for the intrauterine assessment of pulmonary maturity by the phospholipids in amniotic fluid, ("Cocobook"), University of California, 1971

- 17 Grabar, P., Williams, C.A.: Méthode immunoélectrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques, Biochem. biophys. Acta (Amst.) 17, 67-74 (1955)

- 18 Greten, H., Seidel, D., Walter, B., Kolbe, J.: Die Lipoproteinelektrophorese zur Diagnose von Hyperlipoproteinämien, Deut. Med. Wochenz. 95, 1716 (1970)

- 19 Greten, H., Seidel, D. Walter, B., Kolbe, J.: Lipoproteinelektrophoresis in the diagnosis of the hyperlipoproteinemias, Ger. Med. Mth., 15, 29-33 (1971)

- 20 Heron, H.J.: The electrophoresis of the proteins in amniotic fluid, J. Obstet. Gyn. Brit. Comm. 73, 91, (1966)

- 21 Jonasson, L.E.: Total Protein content in Amniotic Fluid From normal Pregnancies And From Pregnancies complicated by RH.Isoimmunization. Acta Obstet Gynec Scand 51: 187-193 (1972)

- 22 O. Käser, V. Friedberg, K.G. Ober, K. Thomsen, J. Zander: Gynäkologie und Geburtshilfe Band II, 1044 (1971)

- 23 Kufner, F.: Der Nachweis und die Identifizierung von Lipoproteinen im Fruchtwasser, Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität München, 1975
- 24 Liley, A.W.: Liquor amnii in the management of the pregnancy complicated by rhesus sensitization
Am. J. Obst. Gyn. 82, 1359-1370, (1961)
- 25 Liley, A.W.: Errors in the assessment of haemolytic disease from amniotic fluid, Am. J. Obst. Gyn. 86, 485, (1963)
- 26 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L.: Protein measurement with the Folin phenol reagent, J. Biolog. Chem. 193, 265-275 (1951)
- 27 Mancini, G., Vaerman, J.P., Carbonara, A.O., Heremans, J.F.: A single-radial diffusion method for the immunological quantitation of proteins, Prac. XI int. Coll. Prot. Biol. Fluids, Bruges, 370-73 (1963)
- 28 Nelson, G.H.: Amer. J. Gynec. Obstet. 112, 827 (1972)
- 29 Nelson, G.H., Lawson, S.W.: Amer. J. Obstet. Gynec. 115, 933 (1973)
- 30 Ouchterlony, Ö.: Antigen-antibody reactions in gels. VI. Types of reactions in coordinated systems of diffusion. Acta path. scand. 32, 231-240 (1953)

- 31 Ouchterlony, Ö.: Prog. Allergy 5, 1 (1958)
- 32 Ouchterlony, Ö.: Prog. Allergy 6, 30 (1962)
- 33 Queenan, J.T., Gadow, E.W., Bachner, P.: Amniotic fluid innormal and Rh sensitized pregnancies, Am. J. Obstet. Gyn. 108, 406-14, (1970)
- 34 Queenan, J.T.: "Amniotic fluid proteins, amniotic fluid amnio acids and their clinical significance" in Fairweather et Eskes: Amniotic Fluid, Excerpta Medica, Amsterdam, 1973
- 35 Seidel, D., Wieland, H., Ruppert, C.: Improved techniques for assessment of plasma lipoprotein patterns, Cli. Chem. 19, 737 (1973)
- 36 Sutcliffe, R.G., Brock, D.J.: Observations on the origin of amniotic fluid enzymes, J. Obst. Gyn. Brit. Comm., 79, 902-10 (1972)
- 37 Sutcliffe, R.G., Brock, D.J.: Immunological Studies on the Nature and Origin of the major Proteins in Amniotic Fluid: J. Obstet. Gynec. Brit. Comm. 80, 721-727 (1973)
- 38 Sutcliffe, R.G.: The Nature and origin of the soluble protein in human amniotic fluid: Biol. Rev., 50, 1-33, (1975)

- 39 Usategui-Gomez, M., Morgan, D.F., Toolan, H.W.:
A comparative Study of amniotic fluid and maternal sera
and cord sera by disc electrophoresis, Proc. Soc. Exp.
Biol. Med. 123, 547 (1966)
- 40 Usategui-Gomez, M., Hopkins, S., Fernandez de Castro, A.:
Serum Proteins in Amniotic Fluids in Erythroblastosis
Fetalis: Obstet a Gynec, 36, No. 6, 865-873, (1970)
- 41 Wengeler, H., Kufner, F., Lochmüller, H.: Lipoproteine
im Fruchtwasser, Vortrag VII, Akademische Tagung
deutschsprechender gynäkologischer Hochschullehrer,
München, 18.-21.6.1975
- 42 Wild, A.E.: The Association between Protein and Bilirubin
in Liquor Amnii Cli. Sci., 21, 221-231 (1961)

Lebenslauf

Am 14. Februar 1949 wurde ich als erstes von drei Kindern des Gynäkologen Dr. med. Ernst Hartog und seiner Frau Marianne, geb. Hahn, in Bielefeld geboren.

Hier besuchte ich auch die Volksschule und das Gymnasium. Im Juli 1967 bestand ich die Reifeprüfung am Max-Planck-Gymnasium in Bielefeld.

Im Sommersemester 1968 begann ich das Medizinstudium an der Universität München. Dort bestand ich im Sommer 1970 mein Physikum und im August 1974 das Staatsexamen. Seit November 1974 bin ich mit Eva-Maria Hartog, geb. Jensen, verheiratet. Im Februar 1976 wurde unser Sohn Moritz geboren.

Herrn Prof. Dr. J. Zander, Direktor der I. Frauenklinik der Universität München, danke ich für die guten Arbeitsbedingungen, die mir an seiner Klinik geboten wurden.

Herrn Priv. Doz. Dr. H. Lochmüller, I. Universitäts-Frauenklinik München, danke ich für die Überlassung des Themas.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. H. Wengeler, wissenschaftlicher Assistent an der I. Universitäts-Frauenklinik München, der mich in die wissenschaftliche Arbeit einführte und mir mit Rat und Tat immer zur Seite stand.

Für weitere labortechnische Anleitung und Hilfe danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. E. Kuss, Leiter der wissenschaftlichen Laboratorien der I. Universitäts-Frauenklinik München, Herrn Prof. Dr. H. Graeff, I. Universitäts-Frauenklinik München und Herrn Prof. Dr. D. Seidel, Leiter des klinischen Laboratoriums der Medizinischen Universitätsklinik Heidelberg.

Mein besonderer Dank gilt der Universität München, die mir durch ein Graduiertenstipendium diese Arbeit ermöglichte.

